

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 38/48</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/03729</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Januar 2000 (27.01.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04406  (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Juli 1998 (15.07.98)  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): UR-SAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE]; Industriesstrasse, D-66129 Saarbrücken (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MAURER, Rainer [DE/DE]; Schopenhauerstrasse 93, D-14129 Berlin (DE). ECKERT, Klaus [DE/DE]; Karower Chaussee 215, D-13125 Berlin (DE). GRABOWSKA, Edyta [PL/DE]; Aristotelessteig 6, D-10318 Berlin (DE). ESCHMANN, Klaus [DE/DE]; Lothringerstrasse 26, D-66271 Kleinblittersdorf (DE).  (74) Anwalt: STRAUS, Alexander; Kirschner & Kurig, Sollner Strasse 38, D-81479 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
<p>(54) Title: USE OF BROMELAIN PROTEASES FOR INHIBITING BLOOD COAGULATION  (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON BROMELAINPROTEASEN ZUR HEMMUNG DER BLUTGERINNUNG  (57) Abstract</p> <p>The invention relates to the use of bromelain proteases for inhibiting the blood coagulation system, notably for stimulating plasmin production, inhibiting fibrin production and inhibiting the adhesion of human thrombocytes to endothelial cells. The basic proteases, which can be isolated from pure bromelain, have proved to be especially suitable proteases.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Diese Erfindung betrifft die Verwendung von Bromelainproteasen zur Hemmung des Blutgerinnungssystems, insbesondere zur Stimulation der Plasmin-Bildung, der Hemmung der Fibrin-Bildung und der Hemmung der Adhäsion humaner Thrombozyten an Endothelzellen. Als besonders geeignete Proteasen haben sich insbesondere die aus Rohbromelain isolierbaren, basischen Proteasen erwiesen.</p>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verwendung von Bromelainproteasen zur Hemmung  
der Blutgerinnung**

5

Diese Erfindung betrifft die Verwendung von Bromelainproteasen, vorzugsweise basischer Bromelainproteasen zur Hemmung des Blutgerinnungssystems, insbesondere zur Stimulation der Plasmin-Bildung, der Hemmung der Fibrin-Bildung und der Hemmung der Adhäsion humaner Thrombozyten an Endothelzellen.

10

Bromelain ist ein aus Pflanzen der Familie Bromeliaceae isolierbares Gemisch unterschiedlichster Proteine, dessen genaue Zusammensetzung aufgrund der Komplexität und Vielfalt der darin enthaltenen Komponenten noch nicht vollständig charakterisiert werden konnte. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Bromelain

15

verschiedene Phosphatasen, Cellulasen, Glycosidasen, Cystein-Proteasen und deren Peptid-Inhibitoren, sowie weitere, noch nicht näher identifizierte Komponenten enthält. Die stoffliche und mengenmäßige Zusammensetzung von Bromelain variiert jedoch in Abhängigkeit von der Herkunft und dem Isolierungsverfahren aus der jeweiligen Quelle, so daß unterschiedliche Verfahren zur Isolierung des Rohprodukts, dessen

20

Standardisierung sowie zur Aufreinigung bestimmter, darin enthaltener Komponenten entwickelt wurden.

25

Einige der Komponenten von Bromelain konnten bereits näher identifiziert werden. So wird von Murachi et al., in The Journal of Biological Chemistry 1 (1960), 99-107 berichtet, daß Bromelain mindestens 5 ähnlich wirkende Proteasen mit unterschiedlicher Substratspezifität und unterschiedlichem pH-Optimum enthält.

30

Bei mit Bromelain durchgeführten Studien wurde weiter gefunden, daß sich dieses Gemisch auch als Arzneimittel zur Behandlung verschiedener Erkrankungszustände einsetzen läßt.

35

So wird in der DE 41 30 221 die Verwendung von Papain und/oder Trypsin, von dem Bromelaingemisch abgeleitete, bestimmte proteolytische Enzyme, zur Herstellung eines Arzneimittels vorgeschlagen, das zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen geeignet sein soll. Gemäß dieser Patentschrift soll das Papain bzw. das Trypsin auf bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligte Proteine einwirken, die eine C<sub>4</sub>-2-Domäne aufweisen.

In der DE 43 02 060 wird weiter die Verwendung von Bromelain als Gemisch zur Krebstherapie und/oder Metastasen-Prophylaxe gelehrt. Dabei wird davon ausgegangen, daß Bromelain auf CD44, ein auf unterschiedlichen Zellen des Organismus vor-  
5 kommendes, stark glycosyliertes Oberflächenprotein einwirkt, dem eine Rolle bei der Tumorentwicklung nachgesagt wird.

In der WO 95/00169 wird die Isolierung und Charakterisierung einer Protease aus dem Bromelaingemisch erläutert, die auf den Syntheseweg cyclischer Nucleotide einwirkt. Das als "Stem Bromelain Protease" bezeichnete Enzym weist 213 Aminosäuren auf und  
10 soll Erkrankungen, wie der Tumorentstehung, Atherosclerose oder auch bakteriellen Infektionen vorbeugen können.

Aufgrund der Entwicklung auf dem Gebiet der Aufreinigungstechniken konnten weitere Komponenten aus dem Bromelaingemisch isoliert und teilweise auch charakterisiert  
15 werden. So wurde von Eckert et al., in The Journal of Protein Chemistry 14 (1995), 41-52 offenbart, daß Bromelain mindestens 8 basische Proteasen enthält, die über FPLC-Kation-Austauschchromatographie fraktioniert werden konnten. Auch zwei Formen saurer Proteasen konnten nachgewiesen werden (Maurer et al., Journal of Protein Chemistry 17 (1998), 351-361.

20 Obwohl für Bromelain bereits verschiedenste medizinische Anwendungsgebiete erkannt wurden, besteht ein Bedarf, weitere Anwendungen für Bromelain aufzufinden. Dabei wäre es aufgrund des nicht vollständig verstandenen Zusammenwirkens der einzelnen Komponenten im Gemisch wünschenswert, für das jeweilige Einsatzgebiet nicht das  
25 Gemisch selbst einzusetzen, sondern nur die für den jeweiligen Zweck verantwortliche Komponente des Gemisches. Dabei tritt jedoch ein Problem auf, da nicht vorhergesagt werden kann, ob einzelne Komponenten im isolierten Zustand ohne andere, im Bromelaingemisch noch vorhandene zusätzliche Stoffe selbst wirksam sind, oder ob diese vielmehr zusätzliche, im Bromelaingemisch vorhandene, jedoch noch nicht  
30 erkannte Komponenten als Hilfsstoffe benötigen.

Eine Aufgabe der Erfindung besteht daher darin, weitere Verwendungsmöglichkeiten für Bromelain, insbesondere deren Komponenten aufzuzeigen.

35 Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, die jeweils für den medizinischen Zweck verantwortliche Komponente(n) aufzufinden und einer medizinischen Verwendung zugänglich zu machen.

Die Erfinder haben umfangreiche Studien durchgeführt und überraschenderweise gefunden, daß allein mit im Bromelaingemisch vorhandenen Proteasen, ohne weitere, in diesem Gemisch vorhandene Komponenten eine Hemmung der Blutgerinnung erzielt werden kann.

5

Die vorstehend aufgeführte Aufgabe wird daher dadurch gelöst, indem die im Bromelaingemisch vorhandenen Proteasen zur Hemmung der Blutgerinnung verwendet werden.

10 Es hat sich gezeigt, daß durch die Bromelainproteasen insbesondere die Bildung von Plasmin gefördert, während die Bildung von Fibrin sowie die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen, Vorgänge, die bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle spielen, gehemmt wird.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden insbesondere basische Proteasen, vorzugsweise die gemäß dem von Eckert et al., in The Journal of Protein Chemistry 14 (1995), 41 - 52 beschriebenen Verfahren als Fraktionen F4, F5 oder, mehr bevorzugt, F9 gewonnenen Bromelainproteasen zu dem angegebenen Zweck eingesetzt.

20

Die in der Fraktion F4 enthaltene Protease weist ein Molekulargewicht von etwa 24,4 KDa auf und besitzt ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca. 4 bis 5,5. Die Protease umfaßt weiter die folgende Aminosäuresequenz:

25 Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

Die in der Fraktion F5 enthaltene Protease weist ein Molekulargewicht von etwa 24,5 KDa auf und besitzt ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca.

30 3,5 bis 5. Die Protease umfaßt weiter die folgende Aminosäuresequenz:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

Die in der Fraktion F9 enthaltene Protease weist ein Molekulargewicht von etwa 23,4-  
KDa auf und besitzt ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca.  
6 bis 8. Die Protease umfaßt weiter die folgende Aminosäuresequenz:

5

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly

Es hat sich nun überraschenderweise gezeigt, daß eine wirksame Hemmung der  
10 Blutgerinnung unter Verwendung von Bromelainproteasen erreicht werden kann, und  
daß diese Hemmung lediglich mit den aus dem Bromelaingemisch isolierten Proteasen  
erreichbar ist, ohne daß dabei andere, im Bromelaingemisch vorhandene, zusätzliche  
Komponenten eine Rolle spielen würden.

15 Die Proteasen können einem Subjekt in einer bereits für das Bromelaingemisch  
bekannten Art und Weise verabreicht werden, d.h. durch intravenöse oder  
intraperitoneale Gabe oder vorzugsweise oral, wobei die Wirkstoffe dann mit im Stand  
der Technik gebräuchlichen Exzipienten formuliert werden, um die Proteasen in aktiver  
20 Form durch den Magen-Darm-Trakt zu bringen und eine systemische Verfügbarkeit zu  
gewährleisten.

Die Proteasen können nach herkömmlichen Verfahren isoliert werden. Insbesondere  
eine Aufreinigung, wie von Eckert et al., in The Journal of Protein Chemistry 14  
(1995), 41 - 52 und von Maurer et al., in The Journal of Protein Chemistry 17 (1998)  
25 angegeben, kann dazu eingesetzt werden. Nach Aufreinigung können die Proteasen  
ansequenziert werden und das entsprechende Gen mittels molekularbiologischer  
Methoden aus dem Genom von beispielsweise der Ananas isoliert werden. Mittels  
molekularbiologischer Methoden kann dann in herkömmlicher Art und Weise ein  
rekombinantes Protein bereitgestellt werden.

30 Die Erfindung wird nun anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben, die lediglich  
zur Erläuterung dienen und nicht als Beschränkung der vorliegenden Erfindung gedacht  
sein sollen.

35 Die in der vorliegenden Erfindung zum Einsatz kommenden Proteasen, insbesondere  
die basischen Proteasen werden isoliert wie von Eckert et al., in The Journal of Protein  
Chemistry 14 (1995), 41 - 52 sowie von Maurer et al., in The Journal of Protein

Chemistry 17 (1998) angegeben. Der Inhalt dieser Druckschriften wird hiermit vollumfänglich in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung miteinbezogen.

Als Beispiel der Auswirkungen von Bromelainproteasen auf die Blutgerinnung wird 5 stellvertretend die gemäß vorstehenden Dokumenten isolierte Fraktion F9 herangezogen.

### Wirkungen von Bromelain F9 auf die Fibrinolyse

10

Zum Nachweis der Wirkung wird eine Bestimmungsmethode eingesetzt, die auf der Verwendung eines chromogenen Substrates in einem photometrischen Nachweissystem basiert. Mit dem verwendeten Testkit Berichrom-Plasminogen (Fa. Behring) wird das Plasminogen der Probe durch Streptokinase in einen Komplex überführt. In dem 15 kinetischen Test kann die Freisetzung von Plasmin durch Zugabe des Plasmin-Substrates über die Extinktionszunahme quantitativ erfaßt werden.

#### Beispiel 1

20 In diesem Experiment wird die fibrinolytische Aktivität von Bromelain F9 der von Bromelain Base Powder (Rohprodukt) und Streptokinase gegenübergestellt.

Ausgangsmaterial für die Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität der zu testenden Protease Bromelain F9 ist das Citratplasma gesunder Spender. 9 Teile Venenblut 25 werden mit 1 Teil Natriumcitratlösung (0,11 Mol/l) gemischt und anschließend 10 min (1500 x g) zentrifugiert. Streptokinase, Urokinase, tPA, Plasmin-Substrat, die Testsubstanz Bromelain F9 sowie die Kunststoffküvetten werden auf 37°C in einem Inkubator vortemperiert. In die Meßküvette werden 20 ml der Plasma-probe, 500 ml der Streptokinase (gebrauchsfertige Test-Kit-Lösung), Urokinase (1U/ml), 30 tPA = Actilyse® (0.58 x 10<sup>6</sup> I.E./ml) oder der Bromelain F9 - Lösung pipettiert. Nach Vermischung wird die Lösung 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 ml Plasmin-Substrat (gebrauchsfertige Test-Kitlsösug) gestartet. Die Extinktion bei 405 nm wird in Abhängigkeit von der Probenkonzentration und der Zeit vermessen.

35

Tabelle 1

Fibrinolytische Aktivität von Streptokinase, Bromelain F9  
und Bromelain Base Powder im Plasminogen-Test

Zeit (s)	Streptokinase (Kit)	Bromelain F9 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			Bromelain Base Powder $50 \mu\text{g}/\text{ml}$
		5	10	30	
30	0,284	0,23	0,315	0,304	0,356
60	0,523	0,424	0,485	0,559	0,449
120	0,741	0,610	0,611	0,795	0,507
180	1,078	0,929	0,929	1,036	0,551

5

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, zeigt Bromelain F9 im kinetischen Test eine der Streptokinase vergleichbare Wirkung. Die Wirkung von Bromelain F9 ist zeit- und konzentrationsabhängig, der Maximaleffekt wird bei 30 mg/ml (1.0 U/mg) erreicht. Bromelain F9 ist bereits bei einer Konzentration von 5mg/ml ( $E = 0.929$ ) der Wirkung 10 des Bromelain-Base Powder (0.4 U/mg) bei einer Konzentration von 50 mg/ml ( $E = 0.55$ ) überlegen.

**Beispiel 2**

15 Das Ziel dieses Experiments besteht darin, zu überprüfen, ob und inwieweit die Kombination von Bromelain F9 mit Streptokinase der Wirkung von Streptokinase alleine überlegen ist.

20

Tabelle 2  
Fibrinolytische Aktivität von Streptokinase alleine  
und in Kombination mit Bromelain F9 im Plasminogen-Test

Zeit (s)	Streptokinase (Kit)	Streptokinase + Bromelain F9
30	0,284	0,246
60	0,523	0,479
120	0,741	0,728
180	1,078	0,939

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, ist die Kombination von Bromelain F9 (10 mg/ml) mit Streptokinase der Wirkung von Streptokinase alleine im Plasminogentest nicht überlegen.

5 Dies kann dahingehend interpretiert werden, daß die Wirkung von Bromelain F9 auf die Fibrinolyse (Bildung von Plasmin) ähnlich ausgeprägt ist, wie die von Streptokinase, jedoch 10- fach (bezogen auf die chemische Konzentration) über der von Bromelain Base Powder liegt. Die Wirkung von Bromelain F9 ist konzentrations-und zeitabhängig. Die Kinetiken entsprechen denen von Streptokinase alleine in diesem System.

10

### Beispiel 3

In diesem Experiment wird ein Vergleich der fibrinolytischen Aktivitäten von Urokinase, Gewebspasminogenaktivator (tPA) und deren Kombinationen mit 15 Bromelain F9 durchgeführt.

Tabelle 3  
Fibrinolytische Aktivität von Urokinase, tPA alleine und der Kombinationen mit Bromelain F9 im Plasminogen-Test

20

Zeit (s)	Urokinase (1U/ml)	tPA $0,58 \times 10^6$ I.E./ml	Urokinase + Bromelain F9 (10 µg/ml)	tPA + Bromelain F9 (10 µg/ml)
30	0,2216	0,2315	0,2757	0,2417
60	0,3517	0,3215	0,3888	0,3124
120	0,5830	0,4469	0,5244	0,4680
180	0,7970	0,7899	0,6640	0,7553

Wie aus dem Vergleich der in Tabelle 1 und Tabelle 3 gezeigten Werte hervorgeht, bewirkt Streptokinase in diesem Testsystem im Vergleich zu Urokinase und tPA eine stärkere Plasminogen-Umsetzung. Die Wirkung von 30 mg/ml Bromelain F9 (Tabelle 25 1, 3) entspricht der Wirkung von Streptokinase und ist der Wirkung von Bromelain Base Powder überlegen. Bei Kombination von Bromelain F9 mit vorstehenden Plasminogen-Aktivatoren sind keine stärkeren Wirkungen im Vergleich zur alleinigen Wirkung von Urokinase und tPA, ebenso wie für Streptokinase (Tabelle 2) nachweisbar.

30

**Wirkung von Bromelain F9 auf die Fibrin-Bildung aus humanem Plasma von gesunden Spendern**

Hierbei soll überprüft werden, ob und inwieweit Bromelain F9 die Thrombin-induzierte  
5 Fibrin-Bildung aus humanem Plasma beeinflußt.

**Beispiel 4**

Ausgangsmaterial ist Citratplasma gesunder Spender, welches mit Bromelain F9 bei  
10 37°C vorinkubiert und anschließend mit Thrombin versetzt wird. Pro Testansatz werden zu 0,05 ml Citratplasma 0,02 ml Proteaselösung pipettiert und für 1 Std inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 0,01 ml Thrombin (0,2 U/ml) und eine Inkubation von 10 min im Wasserbad bei 37°C. Die Fibrinbildung wird semiquantitativ, organoleptisch unter dem Invertmikroskop (20-fache Vergrößerung)  
15 bewertet.

Dabei wird gefunden, daß Bromelain F9 (100 mg/ml) ebenso wie Streptokinase die Thrombin-induzierte Fibrinbildung aus Citratplasma vollständig verhindert. Auf der Basis der eingesetzten chemischen Konzentration ist Bromelain F9 um den Faktor 20 wirksamer als Bromelain Base Powder. Dagegen ist Papain (100 mg/ml, spezifische Aktivität 7,1 U/mg) unter diesen Bedingungen wirkungslos.

**Wirkung von Bromelain F9 auf die Adhäsion von humanen Thrombozyten an  
25 BKEz-7 Rinder-Endothelzellen**

Aus humanem Vollblut isolierte Thrombozyten werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2,7-Bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluoresceinacetoxymethylester markiert. Permanente BKEz-7 Rinderaorta-Zellen (11.-22. Passage) werden zu 60.000 Zellen pro  
30 Vertiefung in eine 96 Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht inkubiert. Für den Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsions-Assay sind  $5 \times 10^7$  Thrombozyten nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C optimal. Die Entfernung der nichtgebundenen Thrombozyten erfolgt durch zweimaliges Waschen der Zellen mit KRB-Puffer (Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 5,6 mMol Glucose + 1 % BSA).

35

**Beispiel 5**

Im Versuchsansatz wird geprüft, welche Wirkung Bromelain F9 auf bereits adhärente Thrombozyten aufweist. Nach Durchführung des Thrombozyten-Endothelzell-

Adhäsions-Assays werden die adhärenen Thrombozyten (stimuliert mit 0.2 U/ml Thrombin) mit Bromelain F9 (0.01 mg/ml) für 10 min bei 37°C inkubiert. Als Vergleich wird Bromelain Base Powder (0.1 mg/ml) mitgeführt. Die resultierenden Thrombozyten-Bindungen an die Endothelzellen werden mit denen der Protease-5 unbehandelten Proben verglichen. Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich, reduziert Bromelain F9 die Thrombozytenbindung um 32% (68% Bindung), während Bromelain Base Powder erst bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml wirksam ist, mit einer Abnahme der Thrombozytenbindung um 40% (60% Bindung).

10

Tabelle 4

Adhäsion von Thrombozyten an BKEz-7 Endothelzellen  
unter dem Einfluß von Bromelain F9

15

- Thrombin	+ Thrombin (0.2 U/ml)	+ Bromelain F9 (0.01 µg/ml)	+ Bromelain Base Powder (0.1 µg/ml)
% Adhäsion			
61*	100	68*	60*

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Thrombin-stimulierten, adhärierten Thrombozyten werden auf 100% normiert;

20 \* p<0.001 (t-Test); im Vergleich zu den adhärenen, Thrombin-stimulierten Thrombozyten sind diese Unterschiede statistisch signifikant.

### Beispiel 6

Isolierte humane Thrombozyten ( $5 \times 10^7$ /ml) werden mit Bromelain F9 und Bromelain 25 Base Powder bei unterschiedlichen Konzentrationen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Proteasen werden durch Zentrifugation (1000 x g) und Waschen entfernt, die Thrombozyten in 1 ml KRB-Puffer (siehe vorstehend) resuspendiert, mit 0.2 U/ml Thrombin inkubiert und in dem Adhäsions-Assay an BKEz-7 Zellen eingesetzt. Die Resultate sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

Adhäsion von Thrombozyten an BKEz-7 Endothelzellen unter  
dem Einfluß von Bromelain F9 und Bromelain Base Powder

5

- Thrombin	+ Thrombin (0,2 U/ml)	+ Bromelain F9 ( $\mu$ g/ml)		+ Bromelain Base Powder $0,1 \mu$ g/ml
		0,005	0,01	
% Adhäsion				
61*	100	86*	75*	69*

\*  $p < 0.001$  (t-Test); im Vergleich zu den adhärenen, Thrombin-stimulierten Thrombozyten sind diese Unterschiede statistisch signifikant.

10

Wie aus der Tabelle 5 ersichtlich, zeigt Bromelain F9 eine konzentrationsabhängige Hemmung der Thrombozyten-Adhäsion an die Endothelzellen. Eine geringere Abnahme der Thrombozyten-Adhäsion wird für Bromelain Base Powder bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml bestimmt.

15

**Patentansprüche**

1. Verwendung von Bromelainproteasen zur Hemmung der Blutgerinnung.
- 5 2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Plasmin-Bildung stimuliert wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Fibrin-Bildung gehemmt wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Adhäsion von Thrombozyten an  
10 Endothelzellen gehemmt wird.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die  
Bromelainproteasen basische Bromelainproteasen sind.
- 15 6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die basische Bromelainprotease eine  
Protease ist, die:
  - ein Molekulargewicht von etwa 24,4 KDa aufweist,
  - ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich  
von ca. 4 bis 5,5 besitzt, und
  - die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:
- 20
- Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn
- 25 7. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die basische Bromelain-  
protease eine Protease ist, die:
  - ein Molekulargewicht von etwa 24,5 KDa aufweist,
  - ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich  
von ca. 3,5 bis 5 besitzt, und
  - die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:
- 30
- Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

8. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die basische Bromelainprotease eine Protease ist, die:

- ein Molekulargewicht von etwa 23,4 KDa aufweist,

5 - ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca. 6 bis 8 besitzt, und

- die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser

10 Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly

9. Arzneimittel zur Hemmung der Blutgerinnung, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel eine oder mehrere Bromelainproteasen enthält.

15 10. Arzneimittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainproteasen basische Bromelainproteasen sind.

11. Arzneimittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainprotease eine basische Bromelainprotease ist, ausgewählt unter einer 20 Protease nach einem der Ansprüche 6 bis 8.

12. Arzneimittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainprotease eine rekombinante Bromelainprotease ist.

SEQUENZ - LISTINGS

## ALLGEMEINE ANGABEN:

## ANMELDER:

NAME : Ursapharm Arzneimittel GmbH

STRASSE: Industriestrasse

ORT: SAARBRÜCKEN

LAND: Deutschland

POSTLEITZAHL: 66129

## BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG :

Verwendung von Bromelainproteasen zur Hemmung der Blutgerinnung

## ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## COMPUTER LESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette

COMPUTER: IBM-PC-kompatibel

BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS

## ANGABEN ZUR SEQ ID NR.1

## SEQUENZKENNZEICHEN:

LÄNGE: 20

ART: Aminosäuren

STRANGFORM: Einzelstrang

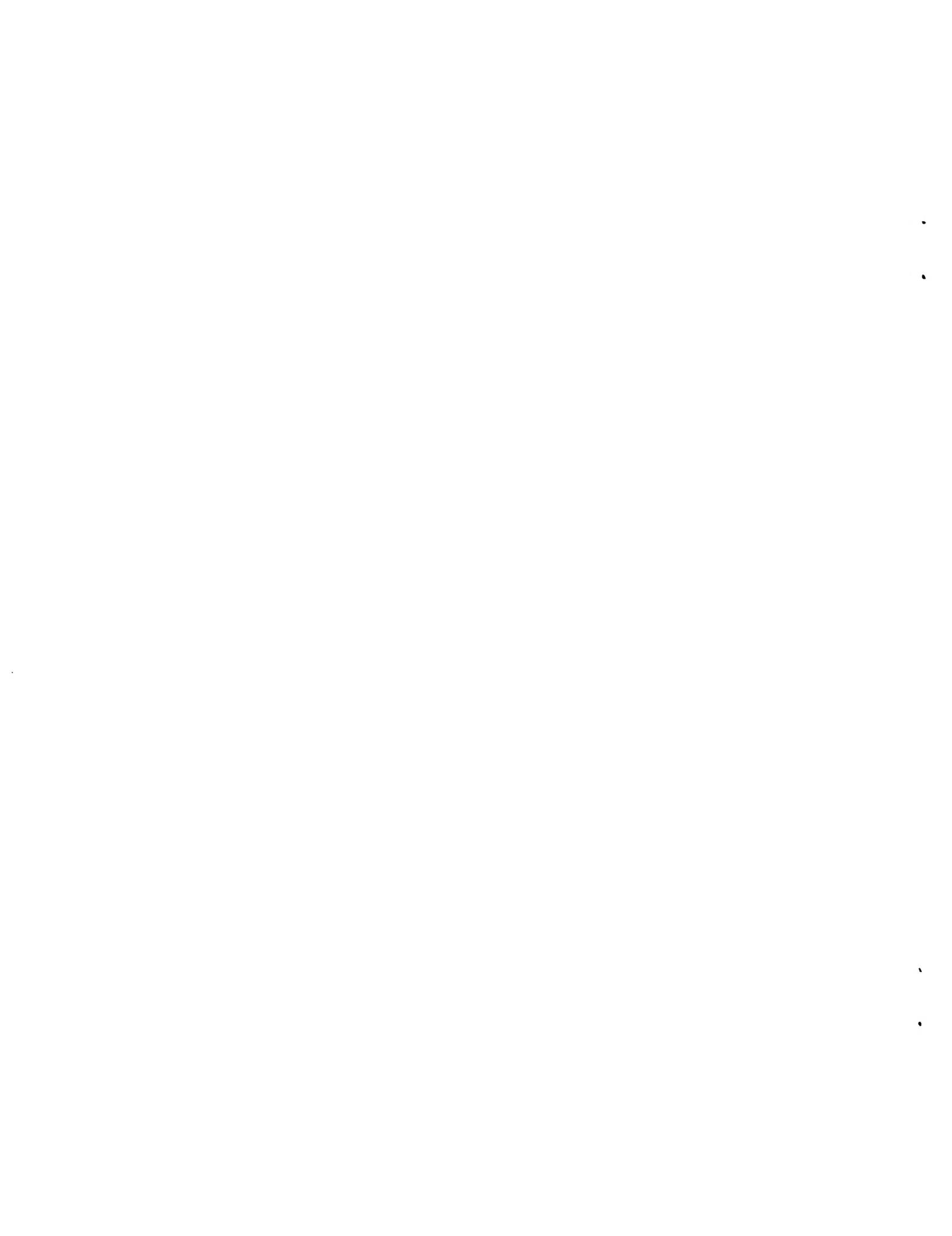
TOPOLOGIE: linear

## URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS : Ananas (Bromeliaceae)

## SEQUENZBESCHREIBUNG:

Val	Pro	Gln	Ser	Ile	Asp	Trp	Arg	Asp	Tyr	Gly	Ala	Val	Thr	Ser	Val
1															15
Lys Asn Gln Asn															



20

## ANGABEN ZUR SEQ ID NR.2

## SEQUENZKENNZEICHEN:

LÄNGE: 20

ART: Aminosäuren

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

## URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS : Ananas (Bromeliaceae)

## SEQUENZBESCHREIBUNG:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser Gly Ala Val Thr Ser Val

1 5 10 15

Lys Asn Gln Gly

20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/04406

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K38/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAUSSIG S J ET AL: "Bromelain, the enzyme complex of pineapple (ananas comosus) and its clinical application. An update" JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, vol. 22, no. 2, 1988, page 191-203 XP002097864 see abstract  see page 193, line 21 - line 25 see page 194, line 40 - page 195, line 7 see page 195, line 38 - page 196, line 4 see page 197, line 35 - page 199, line 11 see page 200, line 5 - line 19 ---	1-3, 9
Y	see page 193, line 21 - line 25 see page 194, line 40 - page 195, line 7 see page 195, line 38 - page 196, line 4 see page 197, line 35 - page 199, line 11 see page 200, line 5 - line 19 ---	5-8, 10-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### ° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 March 1999

Date of mailing of the international search report

13/04/1999

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/04406

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HARRACH T ET AL: "ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BASIC PROTEINASES FROM STEM BROMELAIN" JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY, vol. 14, no. 1, January 1995, pages 41-52, XP002069063 cited in the application See the whole document, in particular: see abstract see page 48; table 2 see page 49; figure 8 ---	5-8, 10-12
X	SUNNY M C ET AL: "Effect of fabrication, sterilization and mediators-blood compatibility of polyurethanes" JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS, vol. 6, no. 3, January 1992, page 261-273 XP002097865 see abstract see page 262, line 14 - line 24 see page 271, line 10 - line 31 ---	1,4
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644 XP002097957 & JP 63 295515 A (KAO CORP), January 1988 see abstract ---	1,2,9
Y	WO 98 38291 A (MYNOTT TRACEY LEHANNE ;CORTECS UK LTD (GB); PEEK KEITH (GB); ENGWE) 3 September 1998 see abstract see page 1, line 3 - line 5 see page 3, line 22 - line 10 see page 5, line 24 - line 27 see page 8, line 12 - line 28 see page 10, line 3 - line 9 see page 12, line 1 - line 21 see claims 1-19 -----	5-8, 10-12
E	WO 98 38291 A (MYNOTT TRACEY LEHANNE ;CORTECS UK LTD (GB); PEEK KEITH (GB); ENGWE) 3 September 1998 see abstract see page 1, line 3 - line 5 see page 3, line 22 - line 10 see page 5, line 24 - line 27 see page 8, line 12 - line 28 see page 10, line 3 - line 9 see page 12, line 1 - line 21 see claims 1-19 -----	1,5,8-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/EP 98/04406**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim(s) 1-8 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Appl. Application No

PCT/EP 98/04406

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9838291	A 03-09-1998	AU 6303698	A	18-09-1998
		AU 6303798	A	18-09-1998
		AU 6303898	A	18-09-1998
		WO 9838319	A	03-09-1998
		WO 9838320	A	03-09-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat...les Aktenzeichen  
PCT/EP 98/04406

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 A61K38/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TAUSSIG S J ET AL: "Bromelain, the enzyme complex of pineapple (ananas comosus) and its clinical application. An update" JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Bd. 22, Nr. 2, 1988, Seite 191-203 XP002097864	1-3, 9
Y	siehe Zusammenfassung  siehe Seite 193, Zeile 21 - Zeile 25 siehe Seite 194, Zeile 40 - Seite 195, Zeile 7 siehe Seite 195, Zeile 38 - Seite 196, Zeile 4 siehe Seite 197, Zeile 35 - Seite 199, Zeile 11 siehe Seite 200, Zeile 5 - Zeile 19 --- -/-	5-8, 10-12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

<p><input checked="" type="checkbox"/> Besonders Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>	<p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25. März 1999	13/04/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Stein, A
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. des Aktenzeichen

PCT/EP 98/04406

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HARRACH T ET AL: "ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BASIC PROTEINASES FROM STEM BROMELAIN" JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY, Bd. 14, Nr. 1, Januar 1995, Seiten 41-52, XP002069063 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument besonders: siehe Zusammenfassung siehe Seite 48; Tabelle 2 siehe Seite 49; Abbildung 8 ----	5-8, 10-12
X	SUNNY M C ET AL: "Effect of fabrication, sterilization and mediators-blood compatibility of polyurethanes" JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS, Bd. 6, Nr. 3, Januar 1992, Seite 261-273 XP002097865 siehe Zusammenfassung siehe Seite 262, Zeile 14 - Zeile 24 siehe Seite 271, Zeile 10 - Zeile 31 ----	1,4
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644 XP002097957	1,2,9
Y	& JP 63 295515 A (KAO CORP), Januar 1988 siehe Zusammenfassung ----	5-8, 10-12
E	WO 98 38291 A (MYNOTT TRACEY LEHANNE ;CORTECS UK LTD (GB); PEEK KEITH (GB); ENGWE) 3. September 1998 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1, Zeile 3 - Zeile 5 siehe Seite 3, Zeile 22 - Zeile 10 siehe Seite 5, Zeile 24 - Zeile 27 siehe Seite 8, Zeile 12 - Zeile 28 siehe Seite 10, Zeile 3 - Zeile 9 siehe Seite 12, Zeile 1 - Zeile 21 siehe Ansprüche 1-19 -----	1,5,8-11

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04406

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 1-8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 98/04406

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9838291 A	03-09-1998	AU	6303698 A	18-09-1998
		AU	6303798 A	18-09-1998
		AU	6303898 A	18-09-1998
		WO	9838319 A	03-09-1998
		WO	9838320 A	03-09-1998

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Annehmers oder Anwalts <b>P20241 Dr. Kö</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 98/04406</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>15/07/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
Annehmer <b>URSAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Annehmer gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3.  **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

wird der vom Annehmer eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

wird der vom Annehmer eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Annehmer kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

**6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_**

wie vom Annehmer vorgeschlagen

weil der Annehmer selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04406

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Bemerkung:** Obwohl der(die) Anspruch(üche) 1-8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 98/04406A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 A61K38/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TAUSSIG S J ET AL: "Bromelain, the enzyme complex of pineapple (ananas comosus) and its clinical application. An update" JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Bd. 22, Nr. 2, 1988, Seite 191-203 XP002097864	1-3, 9
Y	siehe Zusammenfassung  siehe Seite 193, Zeile 21 - Zeile 25 siehe Seite 194, Zeile 40 - Seite 195, Zeile 7 siehe Seite 195, Zeile 38 - Seite 196, Zeile 4 siehe Seite 197, Zeile 35 - Seite 199, Zeile 11 siehe Seite 200, Zeile 5 - Zeile 19 --- -/-	5-8, 10-12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
 "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
 "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  
 "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  
 "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist  
 "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden  
 "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist  
 "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25. März 1999	13/04/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Stein, A
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------



## INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 98/04406

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HARRACH T ET AL: "ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BASIC PROTEINASES FROM STEM BROMELAIN" JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY, Bd. 14, Nr. 1, Januar 1995, Seiten 41-52, XP002069063 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument besonders: siehe Zusammenfassung siehe Seite 48; Tabelle 2 siehe Seite 49; Abbildung 8 ---	5-8, 10-12
X	SUNNY M C ET AL: "Effect of fabrication, sterilization and mediators-blood compatibility of polyurethanes" JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS, Bd. 6, Nr. 3, Januar 1992, Seite 261-273 XP002097865 siehe Zusammenfassung siehe Seite 262, Zeile 14 - Zeile 24 siehe Seite 271, Zeile 10 - Zeile 31 ---	1,4
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644 XP002097957 & JP 63 295515 A (KAO CORP), Januar 1988 siehe Zusammenfassung ---	1,2,9
Y	WO 98 38291 A (MYNOTT TRACEY LEHANNE ;CORTECS UK LTD (GB); PEEK KEITH (GB); ENGWE) 3. September 1998 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1, Zeile 3 - Zeile 5 siehe Seite 3, Zeile 22 - Zeile 10 siehe Seite 5, Zeile 24 - Zeile 27 siehe Seite 8, Zeile 12 - Zeile 28 siehe Seite 10, Zeile 3 - Zeile 9 siehe Seite 12, Zeile 1 - Zeile 21 siehe Ansprüche 1-19 -----	5-8, 10-12
E	-----	1,5,8-11



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/04406

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9838291	A 03-09-1998	AU	6303698 A	18-09-1998
		AU	6303798 A	18-09-1998
		AU	6303898 A	18-09-1998
		WO	9838319 A	03-09-1998
		WO	9838320 A	03-09-1998



**Patent Claims**

1. Use of bromelaine proteases for inhibiting blood coagulation.
- 5 2. The use according to claim 1, wherein the plasmin production is stimulated.
3. The use according to claim 1, wherein the production of fibrin is inhibited.
- 10 4. The use according to claim 1, wherein the adhesion of thrombocytes on endothelium cells is inhibited.
5. The use according to one of the preceding claims, wherein the bromelaine proteases are basic bromelaine proteases.
- 15 6. The use according to claim 5, wherein the basic bromelaine protease is a protease, having:
  - a molecular weight of about 24.4 KDa,
  - an optimal activity at a pH in the range of 4 to 5.5, and
  - 20 - comprising the following amino acid sequence:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

- 25 7. The use according to claim 5, wherein the basic bromelaine protease is a protease, having:
  - a molecular weight of about 24.5 KDa,
  - an optimal activity at a pH in the range of 3.5 to 5, and
  - comprising the following amino acid sequence:

30 Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

- 35 8. The use according to claim 5, wherein the basic bromelaine protease is a protease, having:
  - a molecular weight of about 23.4 KDa,
  - an optimal activity at a pH in the range of 6 to 8, and



- comprising the following amino acid sequence:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly.

5

9. Medicament for inhibiting blood coagulation, characterized in that said medicament contains one or more bromelaine proteases.
10. Medicament according to claim 9, characterized in that said bromelaine proteases are basic bromelaine proteases.
11. Medicament according to claim 9, characterized in that said bromelaine protease is a basic bromelaine protease selected from a protease according to one of the claims 6 to 8.
- 15 12. Medicament according to claim 9, characterized in that the bromelaine protease is a recombinant bromelaine protease.



M-H

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 17 March 2000 (17.03.00)	in its capacity as elected Office
International application No. PCT/EP98/04406	Applicant's or agent's file reference P20241 Dr.Kö
International filing date (day/month/year) 15 July 1998 (15.07.98)	Priority date (day/month/year)
Applicant MAURER, Rainer et al	

## 1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 09 February 2000 (09.02.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election  was was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer F. Baechler Telephone No.: (41-22) 338.83.38
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

STRAUS, Alexander  
Becker, Kurig, Straus  
Bavariastrasse 7  
D-80336 München  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 17 March 2000 (17.03.00)	
Applicant's or agent's file reference P20241 Dr.Kö	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP98/04406	International filing date (day/month/year) 15 July 1998 (15.07.98)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant  the inventor  the agent  the common representative

Name and Address STRAUS, Alexander Kirschner & Kurig Sollner Strasse 38 D-81479 München Germany	State of Nationality	State of Residence
Telephone No. 089/749 858-0		
Facsimile No. 089/749 858-11		
Teleprinter No.		

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person  the name  the address  the nationality  the residence

Name and Address STRAUS, Alexander Becker, Kurig, Straus Bavariastrasse 7 D-80336 München Germany	State of Nationality	State of Residence
Telephone No. 089/746 303-0		
Facsimile No. 089/746 303-11		
Teleprinter No.		

## 3. Further observations, if necessary:

The indication of a new address of the agent on the demand (Form PCT/IPEA/401) has been considered a request for recording a change under Rule 92bis. In case of disagreement, the International Bureau should be notified immediately.

## 4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer F. Baechler
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



09/16744738 (50-60)  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

JUN 20 2002

TECH CENTER 1600/2900

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 80054 WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/04406	International filing date (day/month/year) 15 July 1998 (15.07.98)	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38/48		
Applicant URSAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

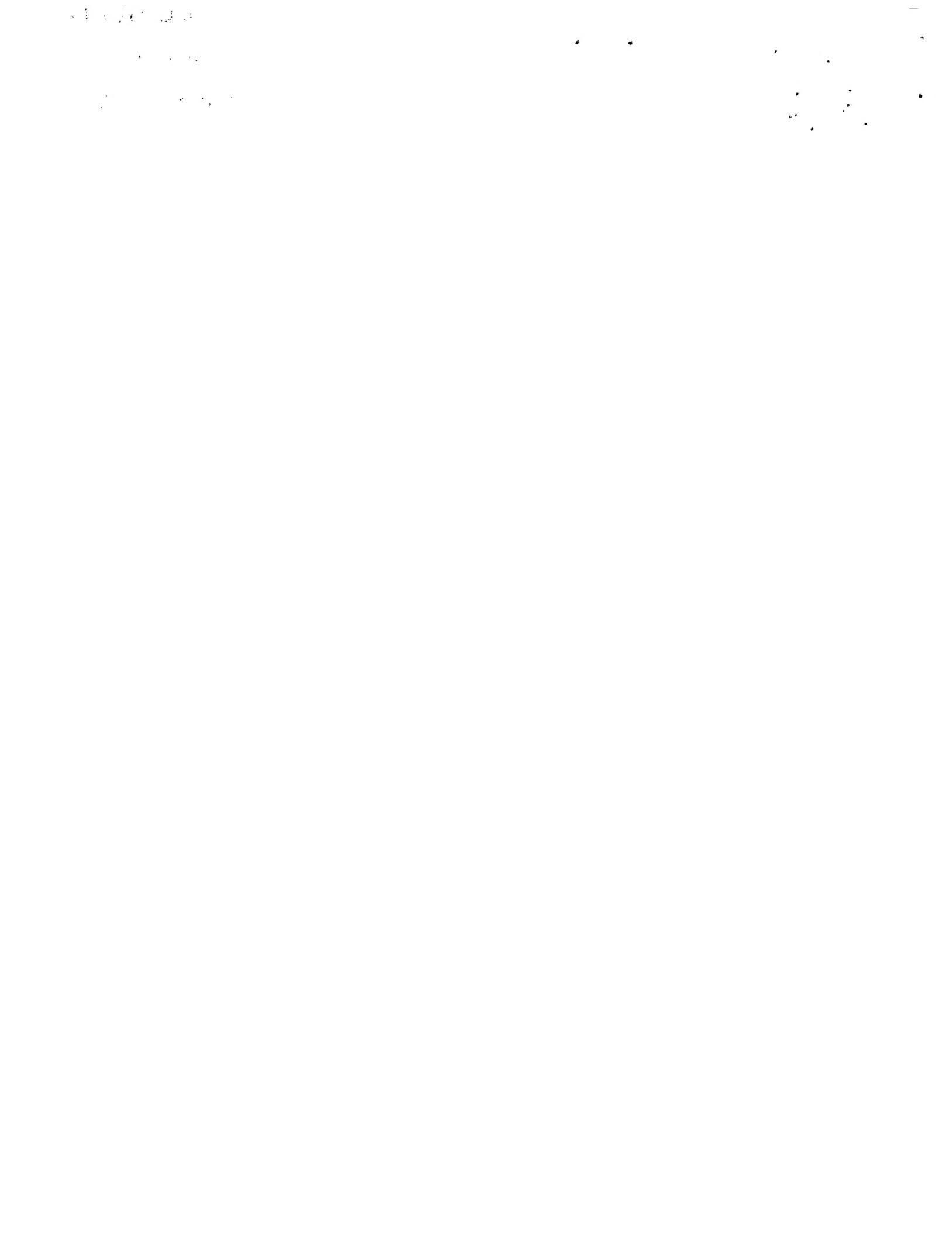
This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09 February 2000 (09.02.00)	Date of completion of this report 06 October 2000 (06.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/04406

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-10, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-6, filed with the letter of 07 August 2000 (07.08.2000),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_

the claims, Nos. \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

## 4. Additional observations, if necessary:



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP98/04406

**III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. 1-4

because:

the said international application, or the said claims Nos. 1-4 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

See annex

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 98/04406

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.

1. In the opinion of the Examining Authority, Claims 1-8 concern subject matter that falls under PCT Rule 67.1(iv). Therefore, no expert opinion will be established concerning the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/04406

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	5, 6; 1-8 (see supplemental sheet)	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

## 2. Reference is made to the following documents:

D1 = TAUSSIG, S. J., et al: "Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update", JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Vol. 22, No. 2, 1988, pp. 191-203, XP002097864

D2 = DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644, XP002097957 & JP-A-63 295 515 (KAO CORP), January 1988.

3. Claims 1-4 satisfy the requirements of PCT Article 33(2) and (3) because their subject matter is novel and involves an inventive step (see below).

3.1 **Novelty**

None of the documents cited in the search report discloses the use for inhibiting blood coagulation of one or more of the basic bromelain proteases characterized by the features appearing in Claim 1 under a), b) and c). (These basic bromelain proteases are hereinafter designated bromelain proteases F4, F5 and F9.)



• 3.2 **Inventive Step:**

D1, which is considered to be the closest prior art, discloses (see the abstract, for example) the use of bromelain to inhibit blood coagulation. It is also taught that bromelain acts fibrinolytically, inhibiting platelet aggregation. According to D1 (see page 195, lines 3-6) this effect correlates with bromelain's proteolytic activity.

Proceeding from D1, the present invention addresses the problem of finding components of the bromelain mixture that inhibit blood coagulation.

As proposed in the claims and supported by the experimental examples in the application, this problem is solved by the basic bromelain proteases F4, F5 and F9.

The basic bromelain protease F4, F5 and F9 are known from D2 (see the abstract, for example). However, D2 neither teaches nor suggests the possible use of these basic bromelain proteases to inhibit blood coagulation.

As set out in the application (see page 2, lines 26-30), it is possible to predict whether individual components in the isolated state are effective *per se* without other substances still present in the bromelain mixture, or whether they require as auxiliary substances additional components that are present in the bromelain mixture but not yet recognized. Based on the teaching of D1, a person skilled in the art could not therefore foresee that the basic bromelain proteases F4, F5, and F9 would solve the problem posed.



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 98/04406

4. Claims 5 and 6 do not satisfy the requirements of PCT Article 33(2) and 33(3). The reasons are the following:

4.1 As noted above, the basic bromelain proteases F4, F5 and F9 are already known from D2. D2 (see page 51, right-hand column, lines 1-8) also teaches that these basic bromelain proteases are effective against tumors. Hence, D2 implicitly teaches and clearly suggests the medical application of such proteases (in the form of a medicament).

4.2 Medicaments containing the basic bromelain proteases F4, F5, and F9 are thus implicitly not novel with respect to D2 and, in any case, are not inventive. [It should be noted that a product is defined only in terms of its components, not its use.]

5. Claims 5 and 6 satisfy the criterion mentioned in PCT Article 33(4) because their subject matter is industrially applicable.

6. PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claims 1-4 in their present form. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognize the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/04406

## VI. Certain documents cited

## 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
-------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------	-------------------------------------------------

## 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)
--------------------------------	----------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------

See annex



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 98/04406

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI.

7. WO-A-98/38291 (priority: 25 February 1997, 28 February 1997, 25 March 1997; application date: 25 February 1998; publication date: 3 September 1998).



09/674778  
5650

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS

T16  
PCT

REC'D 10 OCT 2000
WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  80054 WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen  PCT/EP98/04406	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  15/07/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)  15/07/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K38/48		
Anmelder  URSAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH et al.		

<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.</p>
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorität</li> <li>III <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li> <li>VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li> </ul>

Datum der Einreichung des Antrags  09/02/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  06.10.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Peris Antoli, B Tel. Nr. +49 89 2399 8476





**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/04406

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.:*)

**Beschreibung, Seiten:**

1-10 ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-6 eingegangen am 07/08/2000 mit Schreiben vom 07/08/2000

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung. Seiten:  
 Ansprüche. Nr.:  
 Zeichnungen. Blatt:  
  
3.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

die gesamte internationale Anmeldung.  
 Ansprüche Nr. 1-4 (gewerbliche Anwendbarkeit).

Begründung:

Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1-4 (gewerbliche Anwendbarkeit) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

**siehe B1blatt**



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/04406

- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-6
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-6
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 5. 6: 1-8 (siehe Beiblatt)
	Nein: Ansprüche

### 2. Unterlagen und Erklärungen

**siehe Beiblatt**

## VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

### 1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

### 2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

**siehe Beiblatt**



**Zu Punkt III**

**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Die Ansprüche 1-8 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

2. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: TAUSSIG S J ET AL: 'Bromelain, the enzyme complex of pineapple (ananas comosus) and its clinical application. An update' JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Bd. 22, Nr. 2, 1988, Seite 191-203  
XP002097864

D2: DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644  
XP002097957 & JP 63 295515 A (KAO CORP), Januar 1988

3. Die Ansprüche 1-4 erfüllen die Erfordernisse des Art. 33(2) und 33(3) PCT, weil ihr Gegenstand neu und erfinderisch ist (siehe unten).

**3.1 Neuheit:**

Keines der im Recherchenbericht zitierten Dokumente offenbart die Verwendung zur Hemmung der Blutgerinnung von einer oder mehreren der basischen Bromelainproteasen, die durch die Merkmale gekennzeichnet sind, die im Anspruchs 1 unter a), b) und c) dargelegten werden. (Diese basische Bromelainprotease werden von nun an als Bromelainproteasen F4, F5 und F9 genannt).



3.2 **Erfind rische Tätigk it:**

D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart (siehe z.B. Zusammenfassung) die Verwendung von Bromelain zur Hemmung der Blutgerinnung. Es wird auch gelehrt, daß Bromelain fibrinolytisch wirkt und die Thrombozyten Aggregation hemmt. Gemäß D1 (siehe Seite 195, Zeilen 3-6) korreliert diese Wirkung mit der proteolitischen Aktivität des Bromelains.

Ausgehend von D1, ist die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe darin zu sehen, daß man Komponente des Bromelaingemisches auffindet, welche die Blutgerinnung hemmen.

Wie in den Ansprüchen vorgeschlagen und durch die experimentellen Beispiele der Anmeldung gestützt, wird diese Aufgabe mit den basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 gelöst.

Die basische Bromelainprotease F4, F5 und F9 sind aus D2 (siehe z.B. Zusammenfassung) bekannt. Die mögliche Verwendung dieser basischen Bromelainproteasen zur Hemmung der Blutgerinnung wird jedoch in D2 weder gelehrt noch nahegelegt.

Wie in der Anmeldung aufgeführt (siehe Seite 2, Zeilen 26-30), kann es nicht vorhergesagt werden, ob einzelne Komponenten im isolierten Zustand ohne andere, im Bromelaingemisch noch vorhandene zusätzliche Stoffe selbst wirksam sind, oder ob diese vielmehr zusätzliche, im Bromelaingemisch vorhandene, jedoch noch nicht erkannte Komponente als Hilfsstoffe benötigen.

Anhand der Lehre aus D1 war es für den Fachmann daher nicht vorhersehbar, daß die basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 die gestellte Aufgabe lösen würden.

4. Die Ansprüche 5 und 6 erfüllen nicht die Erfordernisse des Art. 33(2) und 33(3) PCT. Die Begründung dafür ist folgende:
  - 4.1 Wie oben angemerkt, sind die basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 aus D2 bereits bekannt. In D2 (siehe Seite 51, rechte Spalte, Zeilen 1-8) wird auch gelehrt, daß diese die basischen Bromelainproteasen gegen Tumoren wirksam



sind. Die medizinische Anwendung solcher Proteasen (in Form eines Arzneimittel) wird somit in D2 implizit gelehrt und deutlich nahegelegt.

- 4.2 Arzneimittel enthaltend die basischen Bromelainproteasen F4, F5 oder F9 sind daher, gegenüber D2 implizit nicht neu und in jedem Fall nicht erfinderisch. [Es wird angemerkt, daß ein Erzeugnis nur durch seine Bestandteile und nicht durch seine Verwendung definiert wird].
5. Die Ansprüche 5 und 6 erfüllen das in Art. 33(4) PCT genannte Kriterium, weil ihr Gegenstand gewerblich anwendbar ist.
6. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-4 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

**Zu Punkt VI**

**Bestimmte angeführte Unterlagen**

7. WO-A-98 38291 (Priorität: 25.02.97/28.02.97/25.03.97; Anmeldetag: 25.02.98; Veröffentlichungstag: 03.09.98).



Anmelder: Ursapharm Arzneimittel GmbH  
Unser Zeichen: 80054 WO  
Amtsaktenzeichen: PCT /EP/98/04406

## Patentansprüche

5 1. Verwendung von Bromelainproteinasen zur Hemmung der Blutgerinnung, wobei die  
Bromelainproteinasen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:

a) einer basischen Bromelainprotease, die

- ein Molekulargewicht von etwa 24,4 KDa aufweist,
- ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 4 bis 5,5 besitzt, und
- die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

15 und/oder

b) einer basischen Bromelainprotease, die

- ein Molekulargewicht von etwa 24,5 KDa aufweist,
- ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 3,5 bis 5 besitzt, und
- die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

20 Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

und/oder

c) einer basischen Bromelainprotease, die

- ein Molekulargewicht von etwa 23,4 KDa aufweist,
- ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 6 bis 8 besitzt, und
- die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

25 Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser  
Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly

30 2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Plasmin-bildung stimuliert wird.



3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Fibrin-Bildung gehemmt wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen gehemmt wird.
5. Arzneimittel zur Hemmung der Blutgerinnung, wobei das Arzneimittel neben herkömmlichen Exzipienten und Hilfsmitteln aus einer oder mehreren Bromelainproteasen nach Anspruch 1 besteht.

10

6. Arzneimittel, nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainprotease eine rekombinante Bromelainprotease ist.



# GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

STRAUS, Alexander  
BECKER-KURIG-STRASUS  
Bavariastrasse 7  
D-80336 München  
ALLEMAGNE

BECKER KURIG STRASUS  
BAVARIASTRASSE 7 · 80336 MÜNCHEN

09. Okt. 2000

WV:

11F: .....

## MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

06.10.2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
80054 WO

### WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/04406	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/07/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/07/1998
------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------	------------------------------------------------

Anmelder  
URSAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.
4. **ERINNERUNG**

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung  
beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx. 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Hundt, D

Tel. +49 89 2399-8042





VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  80054 WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen  PCT/EP98/04406	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  15/07/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)  15/07/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK  A61K38/48		
Anmelder  URSAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  <input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.
3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:  I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  09/02/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  06.10.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Peris Antoli, B Tel. Nr. +49 89 2399 8476





**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-10 ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-6 eingegangen am 07/08/2000 mit Schreiben vom 07/08/2000

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung. Seiten:  
 Ansprüche. Nr.:  
 Zeichnungen. Blatt:

3.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

die gesamte internationale Anmeldung.  
 Ansprüche Nr. 1-4 (gewerbliche Anwendbarkeit).

Begründung:

Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1-4 (gewerbliche Anwendbarkeit) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

si he B iblatt



- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-6
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-6
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 5, 6; 1-8 (siehe Beiblatt)
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

**siehe Beiblatt**

**VI. Bestimmte angeführte Unterlagen**

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

**siehe Beiblatt**



**Zu Punkt III**

**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Die Ansprüche 1-8 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

2. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:
  - D1: TAUSSIG S J ET AL: 'Bromelain, the enzyme complex of pineapple (ananas comosus) and its clinical application. An update' JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Bd. 22, Nr. 2, 1988, Seite 191-203  
XP002097864
  - D2: DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644  
XP002097957 & JP 63 295515 A (KAO CORP), Januar 1988
3. Die Ansprüche 1-4 erfüllen die Erfordernisse des Art. 33(2) und 33(3) PCT, weil ihr Gegenstand neu und erfinderisch ist (siehe unten).
  - 3.1 **Neuheit:**  
Keines der im Recherchenbericht zitierten Dokumente offenbart die Verwendung zur Hemmung der Blutgerinnung von einer oder mehreren der basischen Bromelainproteasen, die durch die Merkmale gekennzeichnet sind, die im Anspruchs 1 unter a), b) und c) dargelegten werden. (Diese basische Bromelainprotease werden von nun an als Bromelainproteasen F4, F5 und F9 genannt).



**3.2 Erfinderische Tätigkeit:**

D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart (siehe z.B. Zusammenfassung) die Verwendung von Bromelain zur Hemmung der Blutgerinnung. Es wird auch gelehrt, daß Bromelain fibrinolytisch wirkt und die Thrombozyten Aggregation hemmt. Gemäß D1. (siehe Seite 195, Zeilen 3-6) korreliert diese Wirkung mit der proteolitischen Aktivität des Bromelains.

Ausgehend von D1, ist die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe darin zu sehen, daß man Komponente des Bromelaingemisches auffindet, welche die Blutgerinnung hemmen.

Wie in den Ansprüchen vorgeschlagen und durch die experimentellen Beispiele der Anmeldung gestützt, wird diese Aufgabe mit den basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 gelöst.

Die basische Bromelainprotease F4, F5 und F9 sind aus D2 (siehe z.B. Zusammenfassung) bekannt. Die mögliche Verwendung dieser basischen Bromelainproteasen zur Hemmung der Blutgerinnung wird jedoch in D2 weder gelehrt noch nahegelegt.

Wie in der Anmeldung aufgeführt (siehe Seite 2, Zeilen 26-30), kann es nicht vorhergesagt werden, ob einzelne Komponenten im isolierten Zustand ohne andere, im Bromelaingemisch noch vorhandene zusätzliche Stoffe selbst wirksam sind, oder ob diese vielmehr zusätzliche, im Bromelaingemisch vorhandene, jedoch noch nicht erkannte Komponente als Hilfsstoffe benötigen.

Anhand der Lehre aus D1 war es für den Fachmann daher nicht vorhersehbar, daß die basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 die gestellte Aufgabe lösen würden.

4. Die Ansprüche 5 und 6 erfüllen nicht die Erfordernisse des Art. 33(2) und 33(3) PCT. Die Begründung dafür ist folgende:

4.1 Wie oben angemerkt, sind die basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 aus D2 bereits bekannt. In D2 (siehe Seite 51, rechte Spalte, Zeilen 1-8) wird auch gelehrt, daß diese die basischen Bromelainproteasen gegen Tumoren wirksam



sind. Die medizinische Anwendung solcher Proteasen (in Form eines Arzneimittel) wird somit in D2 implizit gelehrt und deutlich nahegelegt.

- 4.2 Arzneimittel enthaltend die basischen Bromelainproteasen F4, F5 oder F9 sind daher, gegenüber D2 implizit nicht neu und in jedem Fall nicht erfinderisch.  
[Es wird angemerkt, daß ein Erzeugnis nur durch seine Bestandteile und nicht durch seine Verwendung definiert wird].
5. Die Ansprüche 5 und 6 erfüllen das in Art. 33(4) PCT genannte Kriterium, weil ihr Gegenstand gewerblich anwendbar ist.
6. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-4 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

**Zu Punkt VI**

**Bestimmte angeführte Unterlagen**

7. WO-A-98 38291 (Priorität: 25.02.97/28.02.97/25.03.97; Anmeldetag: 25.02.98; Veröffentlichungstag: 03.09.98).



Anmelder: Ursapharm Arzneimittel GmbH  
Unser Zeichen: 80054 WO  
Amtsaktenzeichen: PCT /EP/98/04406

## Patentansprüche

5 1. Verwendung von Bromelainproteininasen zur Hemmung der Blutgerinnung, wobei die Bromelainproteininasen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:

a) einer basischen Bromelainprotease, die

- ein Molekulargewicht von etwa 24,4 KDa aufweist,

- ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 4 bis 5,5 besitzt, und

- die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr

Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

15 und/oder

b) einer basischen Bromelainprotease, die

- ein Molekulargewicht von etwa 24,5 KDa aufweist,

- ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 3,5 bis 5 besitzt, und

- die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

20 Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr

Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

und/oder

c) einer basischen Bromelainprotease, die

25 - ein Molekulargewicht von etwa 23,4 KDa aufweist,

- ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 6 bis 8 besitzt, und

- die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser

30 Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Plasmin-bildung stimuliert wird.



3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Fibrin-Bildung gehemmt wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen gehemmt wird.
5. Arzneimittel zur Hemmung der Blutgerinnung, wobei das Arzneimittel neben herkömmlichen Exzipienten und Hilfsmitteln aus einer oder mehreren Bromelainproteasen nach Anspruch 1 besteht.
- 10 6. Arzneimittel, nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainprotease eine rekombinante Bromelainprotease ist.

